

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-004869

(43)Date of publication of application : 09.01.1992

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : 02-105878

(71)Applicant : TORAY IND INC

(22)Date of filing : 20.04.1990

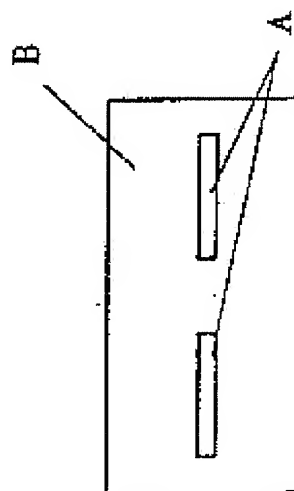
(72)Inventor : MATSUDA TAKEHISA
KURUMAYA HAJIME

(54) SUBSTRATE FOR CELL CULTURE AND METHOD FOR CELL CULTURE USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject substrate, composed of two parts having different advance contact angles with water and capable of carrying out cell culture in a state closer to that in a living body, three-dimensionally aggregating cells, forming tissues and organs and providing capillary vessels, livers, spleens, etc.

CONSTITUTION: The objective substrate, composed of a part (A) (preferably a hydrogel) having an advance contact angle with water of $20-50^{\circ}$, preferably $20-40^{\circ}$ and a part (B) (preferably a polyolefin or polyester) having an advance contact angle with water of $50-100^{\circ}$, preferably $60-90^{\circ}$.



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-4869

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)1月9日

C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

Z

8717-4B

7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑮ 発明の名称 細胞培養基材およびそれを用いる細胞培養方法

⑯ 特 願 平2-105878

⑰ 出 願 平2(1990)4月20日

⑱ 発 明 者 松 田 武 久 大阪府箕面市栗生外院244-1 箕面東コーポラスB-512
⑱ 発 明 者 車 谷 元 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内
⑲ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

細胞培養基材およびそれを用いる細胞培養方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 水との前進接触角が20度以上50度未満である部位(A)と、水との前進接触角が50度以上の100度未満の部位(B)からなる細胞培養基材。
- (2) 部位(A)がヒドロゲルからなる請求項1記載の細胞培養基材。
- (3) 部位(B)がポリオレフィンまたはポリエステルからなる請求項1または2記載の細胞培養基材。
- (4) 請求項1～3記載の細胞培養基材を用いることを特徴とする細胞培養方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、より生体内に近い状態で細胞を培養できる新規細胞培養基材および細胞培養法を提示する。また、本発明により得られる細胞は、ハイ

ブリッド型人工臓器、例えば人工皮膚、人工肝臓、人工血管などを作成する際に用いることができる。

[従来の技術]

生体外で細胞を培養し増殖させる、いわゆる細胞培養技術は、研究室レベルから各種の生理活性物質の生産などの工業的なレベルまでその利用が活発になってきた。株化していない、いわゆる正常細胞は、普通その生育には基材への接着を必要とする。このため細胞の生育に適当な各種の高分子材料の開発が行なわれてきた。一例を挙げると、組織培養フラスコやマイクロビーズなどが挙げられる。

しかしながら、従来の培養法は主として株化細胞や線維芽細胞などに限られ、肝細胞などの高次の機能を有する細胞を機能の低下をきたすことなく長期間維持したり、細胞を増やすことは困難であった。また、細胞を基材上で単層に生育させるものがほとんどであった。一例を挙げると、ガラス、表面をグロー放電処理したポリスチレン、あるいは適度の正電荷を有する多糖ビーズなどであ

る。これらの基材上では細胞は単層に生育し、基材の表面全体を被覆した後、コンフレントとなって生育を停止することが知られていた。

一方、培養細胞を三次元的に集合させ高次の組織や器官を形成させるなど、より生体内に近い状態で培養する手法はあまり知られていなかった。こうした試みの中の1つに、コラーゲンゲル内培養法があり、本法では細胞は三次元的に集合することで、より生体内に近い状態で培養が可能であることが知られている。

しかしながら、コラーゲンゲルは強度が低く、手間がかかり、また高価であるため、その使用は実験室レベルに限られていた。

[発明が解決しようとする課題]

従来の培養法では、生体内で高次の機能を有する細胞を長期間維持することが困難であった。また、コラーゲンゲル内培養などの特殊な培養法を用いなければ、細胞を材料表面で単層に培養するだけで、生体内のように多数の細胞が三次元的に集合し独自の機能を果たす、いわゆる組織や器

官の形成までいたらしめることはできなかった。

すなわち、本発明の目的は、細胞を三次元的に集合させ得る、より生体内に近い状態で培養することである。

[課題を解決するための手段]

本発明の目的は、水との前進接触角が20度以上50度未満である部位(A)と、水との前進接触角が50度以上100度未満の部位(B)からなる細胞培養基材により達成される。

本発明で用いる細胞は、例えば血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝実質細胞、脾上皮細胞、線維芽細胞、あるいはH e L a細胞、L細胞などの株細胞などである。

特に、生体内で三次元的に集合体を形成している細胞群、例えば肝実質細胞、脾上皮細胞などはこの手法により細胞を多数集合させると次第に機能分化を示し、単層で培養するよりも形態的、あるいは機能的に生体内に近い状態で培養することが可能であるので好ましい。

本発明の水との接触角とは、水の自由表面が固

体壁に接する場所で、液面と固体面とのなす角(液の内部にある角をとる)をいい、前進接触角とは、ぬれていない新しい表面での接触角である。

本発明の部位(A)は、水との前進接触角が20度以上50度未満である必要があり、好ましくは20度以上40度以下である。

このような水との前進接触角を持つ基材は、例えば、次の各手法によって得られる。

- 1) 接触角の高い基材の接触角を低下させる。
- 2) 接触角の低い基材の接触角を上げる。
- 3) 直接目的の接触角を有する材料を得る。

1)の手法において、接触角の高い材料としては、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネイト、ポリアクリロニトリルなど、フィルムにした際、表面での水滴の接触角が60度以上90度未満である材料が挙げられる。

このような基材の水との接触角を20度以上50度未満にする方法として、

A) 親水性ポリマーで上述の細胞付着性材料の

表面を、グラフト反応、カップリング反応などによって修飾する方法

B) 低分子化合物による修飾反応によって、水酸基などの親水性の官能基を導入する方法などがある。

A)の手法をとる際に用いることのできる親水性ポリマーとしては、ポリエチレンオキシド、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシメチルメタクリレート、セルロース誘導体(例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース)、アミロース、アルギン酸など、あるいはこれらの共重合体および誘導体がある。また、アルブミンなどの親水性の生体内物質を固定化してもよい。

(A)の手法の中でも、基材としてポリ塩化ビニルを用い、親水性ポリマーとしてポリエチレンオキシドを用いるのが好ましい。

また、B)の手法をとる際に用いる官能基は、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基がある。

本手法をとる際は、使用する材料によって反応を選ぶ必要があり、例えばポリエステルなどでは水酸化ナトリウムにより表面を加水分解によって導入する方法がある。

2) の例を挙げると、本発明において見い出された接触角よりも、低い接触角を有する材料としては、表面での水の接触角が低い材料、例えばセルロースおよびその誘導体、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリエチレンオキシド、ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシメチルメタクリレートなどと、その共重合体および誘導体などがある。

これらの細胞付着性の低い材料に、本発明に適した細胞付着性を賦与する手法として、表面に疎水性の低分子化合物やポリマーを表面カップリング反応あるいはグラフト反応によって導入したり、化学架橋剤によって表面を修飾するなどの方法がある。

ここで用いる低分子化合物としては、例えばア

ルキルイソシアネート、アルキルグリシジルエーテルなどが挙げられ、架橋剤としては、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ヘキサメチレンジイソシアネート、グリセロールポリグリシジルエーテル、ジグリセロールポリグリシジルエーテル、両末端に活性エステル基を有するポリエチレンオキシド、グルタルアルデヒドなどがある。

また、3) の例を挙げると、オレフィン、スチレン、塩化ビニル、アクリロニトリルなどの疎水性モノマーと親水性モノマー、例えばポリエチレンオキシドを含むビニル系モノマー、アクリル酸、ビニルアルコール、ビニルピロリドン、アクリルアミド、ヒドロキシメチルメタクリレート、アルギン酸の共重合体などが挙げられる。

この共重合体の割合としては、例えばポリアクリロニトリルとポリビニルピロリドンの共重合体では、ポリビニルピロリドンの割合が5～30%が好ましい。

本発明の部位(A)は、ヒドロゲルからなるものが好ましい。ここでいうヒドロゲルとは、コロイド溶液がジェリー状に固化したものであるゲルのうち、多量の水を含むものであり、含水率30～98%のものが好ましく用いられる。このヒドロゲルとしては、例えばセルロースおよびその誘導体、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリビニルピロリドンを30～98%含むポリ塩化ビニル、ポリアクリロニトリルまたはポリスチレンなどの重合体、あるいはデンプン、アガロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースの架橋体などが挙げられる。

また、部位(A)としては、細胞接着因子として知られるコラーゲンフィブロネクチン、ビトロネクチン、あるいはラミニンをイオン結合あるいは共有結合にて固定化したもの、あるいは3級または4級アミノ基などの強い正電荷を持つ基材は、基材への細胞接着性が向上するため、細胞が基材表面の全面を単層に被覆し、三次元集合体を形成しないため、好ましいものではない。

本発明の細胞培養基材は、上述の水との前進接触角20度以上50度未満の部位(A)と、水との前進接触角50度以上100度未満の部位(B)からなり、部位(B)は好ましくは水との前進接触角60度以上90度未満が好ましい。

部位(B)は、水との前進接触角が50度以上100度未満であれば特に限定されないが、ポリエチレン、ポリプロピレンなどのポリオレフィン、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレートなどのポリエステル、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリロニトリル、ポリカーボネートが好ましく用いられる。

本発明の細胞培養基材において、水との前進接触角が20度以上50度未満である部位(A)と、水との前進接触角が50度以上の部位(B)を作する方法には、例えば、

A) 第2図に示すように、適度の細胞接着性を有する材料と、細胞付着性の高い材料を重層し周りを抑える方法

B) 両者を接着剤を用いて付着させる方法

C) 材料表面の部分的な化学修飾反応によって
両部位を得る方法

などがあるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

上述の方法の中でも(A)の重層し、周りを抑える方法が簡便で好ましい。

本発明において、水との前進接触角が20度以上50度未満である部位(A)と、水との前進接触角が50度以上100度未満の部位(B)の割合やその形状は特に制約されないが、通常は、部位(A)と部位(B)の面積比率が2:1~20:1のものが用いられ、その形状としては、長方形あるいは丸型のものが用いられる。

また、使用する細胞あるいは目的とする組織の形状により適宜工夫して用いるのが好ましい。

一例を挙げると、内皮細胞から毛細血管への組織形成の場合には、第2図に示すような長方形が好ましく用いられる。部位(A)と部位(B)の間隔としては、細胞がB間をはしわたしできるように、Bの開口部は幅1mm~5cmが好ましく、さ

らに1mm~1cmが好ましい。

本発明では、従来の細胞付着の強固な材料と比べて、細胞の増殖が悪い傾向が認められる。このため基材上に播種する細胞数は多い方がよく、基材1cm²あたり1~10⁴から1~10⁶程度が好ましい。

本発明の細胞培養方法としては、通常の手法が用いられるが、例えば、日本組織培養学会編、組織培養の技術第二版(朝倉書店)に記載された手法を細胞の種類に応じて用いればよい。

本発明の細胞培養基材を用いて細胞培養を行なうと培養細胞が集合し、毛細血管、肝、脾といった組織および器官が形成されることを見出した。

この理由は十分明らかではないが、次のような理由が考えられる。

① 水との接触角が20度以上50度未満の基材のみの場合より、細胞が三次元的な集合体を形成したときに、細胞集合体全体が基材から浮遊しにくくなり、本基材上ではある程度基材と接触したままとどまれること。

② 特に、血管内皮細胞の場合、水との接触角が20度以上50度未満の基材上で培養された細胞は互いに集合し、細胞集合体全体に収縮力を生じる。本基材では、この収縮力を細胞接着性の部位間で受け止めることができるため、なんらかの遺伝子発現の変化を生じ毛細血管がより形成しやすくなる。

[実施例]

以下、実施例に従って本発明を説明する。

実施例 1

市販のセルロース透析膜(ユニオンカーバイト社製)を10%プロピルイソシアネートDMSO溶液に浸漬し、攪拌しつつ40℃で1時間反応させた。反応の進行は、反応時間の経過に伴ない、材料表面の窒素原子が増加することをESCAによって観察するとともに、接触角が増加することによって確認した。

第1、2図に示すように、反応時間1時間の化学修飾セルロース膜(接触角35度)をスライドガラス上におき、上部から長さ10mm、幅1mmの

穴のあいたポリエステルフィルム(接触角70度)を重ねた後、チャンバーにセットした。

牛大動脈から単離し、組織培養用フラスコで増殖させた血管内皮細胞を、上述のフィルム1cm²あたり5×10⁴個まき炭酸ガスインキュベーター内で培養した。

本基材上で培養した細胞の培養1日目の形態は、比較的丸い形であった。3日目では細胞同士が集合して、基材から離れた細胞を含めて細胞集合体を形成した。7日目には凝集した細胞は部位(B)のポリエステルフィルムの開口部をつなぐ形で細長い高次集合体を形成した。集合体の断面の走査型および透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞同士の境界が曖昧で細胞同士が非常に強固に結合していること、断面に管腔構造が観察されたことより、本構造体が毛細血管であることが確認された。本毛細血管はチャンバー10個中8個で観察された。

比較例 1~3

比較例1として実施例1で用いたセルロース膜

(水との前進接触角15度)を、比較例2として10%プロピルイソシアネートDMSO溶液と24時間反応させたセルロース膜(水との前進接触角65度)を、比較例3として市販のポリエステルフィルム(接触角70度)を用いて実施例1と同様に検討した。

無処理のセルロースフィルム(比較例1)を用いたときには、細胞は基材にほとんど付着せず、従って毛細血管は形成されなかった。また、反応時間24時間のもの(比較例2)およびポリエステルフィルム(比較例3)では、培養1日目では細胞は実施例1と比較し、より伸展した形状を示し、3日目では増殖するものの基材に強固に付着しており、実施例のように細胞が基材から離れる例は観察されなかった。7日目には細胞は、いわゆるコンフレントの状態になって増殖は停止し、実施例1のような毛細血管の形成は認められなかった。

[発明の効果]

本発明により、より生体内に近い状態で細胞培

養が行なえるため、細胞を三次元的に集合させることができ、組織、器官の形成が可能となる。従って、本発明により毛細血管、肝、脾などを得ることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本実施例で用いる細胞培養チャンバーである。

第2図は、内皮細胞を用いる際の細胞培養基材の平面図である。

1…化学修飾されたセルロースフィルム部位
(A)

2…ポリエステルフィルム部位(B)

3…スライドガラス

4…押さえ

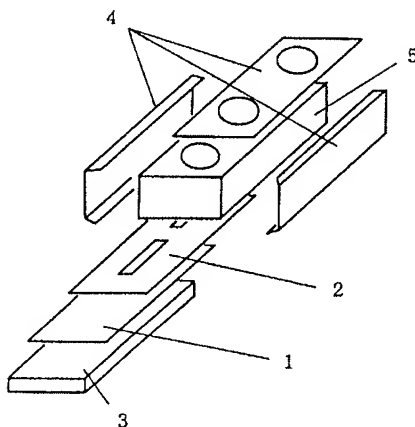
5…シリコン・ゴム

A…水との前進接触角20度以上50度未満の部位(A)

B…水との前進接触角50度以上100度未満の部位(B)

特許出願人 東レ株式会社

第1図



第2図

